

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770141

研究課題名（和文）BAFを用いた1細胞レベルでのストレス応答性転写制御可視化システムの構築

研究課題名（英文）Development of visible system for stress-responsible transcriptional regulation at single-cell level using BAF

研究代表者

星野 英人 (HOSHINO HIDETO)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：20371073

研究成果の概要：

本研究の主題は、1細胞レベルで起こる転写制御の変化を生物発光技術のみによりリアルタイムかつ定量的に評価するシステムを構築することにある。ストレス応答性転写因子の経時空間的な細胞内局在変化とその転写制御機構を対象とした“リアルタイム”生物発光イメージング技術への発展と二色同時観察のための新規の生物発光プローブ群などの基盤技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング・自己励起蛍光タンパク質・生物発光共鳴エネルギー移動・転写制御・ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 生細胞イメージング技術

生細胞内でのタンパク質の挙動をモニターするのにオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein、GFP）を用いた蛍光イメージングが主流であるが、蛍光法の原理故に飽くまで定性的な手法であり、定量性を求めることは難しかった。一方、ホタルルシフェラーゼを用いた生細胞イメージングは、概日リズム研究分野でいち早く用いられたが、その主たる目的は個々の細胞におけるレポーター遺伝子（即ちホタルル

シフェラーゼ）の定量にあった。ホタルルシフェラーゼの生細胞での発光は、蛍光法に比べて圧倒的に光量に乏しく、実際の測定は、個々の細胞を区別できる程度の低倍率レンズと高感度 CCD カメラを用いて、尚かつ更に光量を増幅するためにビニング処理を施した上で、30分～1時間という長時間の露光により為されていた。故に個々の細胞を区別して認識できる程度の空間分解度クオリティーであり、時間分解能と共に“リアルタイム細胞イメージング技術”としては極めて実用性が低いと考えられていた。

(2) 自己励起蛍光タンパク質・BAF の開発  
天然に GFP を有するオワンクラゲは、生体内で起こす生物発光のエネルギーを利用して GFP の緑色蛍光を生じさせる機序を内在性に備えている。この現象は、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) として知られている。オワンクラゲから GFP が単離されて以来、GFP を利用する気運が先行するあまり、ある種の生物が本来備えている、生物体内での GFP の発光現象の本質は久しく置き去りにされていた。本研究代表者は、世界に先駆け、BRET を利用した全く新しい概念の生物発光プローブとして、自己励起蛍光タンパク質・BAF を開発した。BAF とは、従来のルシフェラーゼよりも数段明るい、GFP を含有する新規の人工ルシフェラーゼでも捉えることも可能である。その証拠に BAF を用いれば、従来のホタルルシフェラーゼでは不可能であった分スケールでのハイクオリティーの生細胞イメージングが可能になった。また、本研究開始当初、ルシフェラーゼ部分により高輝度の高発光変異体を用いることで、オリジナルのルシフェラーゼよりも、発光輝度を 26 倍程度高めることも可能であることも判りつつあった。

### (3) 生物発光レポーター解析技術

従来転写制御解析は専らルシフェラーゼをレポーターとして利用することでなされていたが、解析対象は飽くまで細胞集団であり、個々の細胞イベントまでは捉えられず、GFP を利用した転写因子の生細胞内挙動など複数の実験系から得られたデータと組み合わせることで総合的な解釈として遺伝子の転写制御メカニズムを推測するのみであり、個々の細胞核の中で起こる遺伝子発現調節イベントを直接観察することは不可能であった。

## 2. 研究の目的

### (1) 同時観察可能な発光プローブの開発

BAF を開発することで、生物発光イメージングを実用レベルにまで引き上げることに成功していたが、利用可能なプローブは一色のみであり、複数の事象をほぼ同時に観察するためには、発光スペクトルを大きく異にする新しい発光プローブが必要になる。因みに BAF はウミシイタケ由来のルシフェラーゼを用いた技術であり、発光エネルギーを付与するルシフェリンとして、セレンテラジンを発光基質として用いる。一方、ホタルなど甲虫系のルシフェラーゼは、発光基質として D-ルシフェリンを発光基質とし、互いに交差反応は起こさない、極めて高い基質特異性を有する。2 色による生物発光イメージングに当たり、甲虫系の赤色ルシフェラーゼとの併用可能性の検討と赤色蛍光タンパク質 (RFP) を用いた BAF の赤色変異体の作製を第一の基

礎技術開発目的とした。

### (2) 従来イメージング技術の改良

近年、レポーター遺伝子の発現変動の可視化を 1 細胞レベルで可能にする技術が国内光学機器メーカーを中心に開発途上にあり、個々の細胞での遺伝子発現解析への道が開けようとしている。但し、現状では単色発光イメージングに特化する傾向が強く、概日リズムなど内因性の転写制御解析に利用が限定されている。一方で、転写制御因子の中には、ストレス応答性に細胞内局在が制御されるものが幾つも報告されているが、同一細胞内での当該因子の挙動とその結果としての転写制御の関連について“直接観察する系”は未だ確立されておらず、ストレス応答性の転写制御因子の細胞内での挙動 (原因) とゲノムベースのストレス応答性転写制御 (結果) を 1 細胞レベルで同時にモニターするシステムの構築が最終的な目標である。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規 BAF 変異体の創製

様々な蛍光タンパク質 (GFP 変異体並びに種々の RFP)、ルシフェラーゼ変異体並びにリンカーペプチドの組合せから成る融合タンパク質を作製し、これを細胞へ導入・発現後、細胞溶解液を調整し、試験管内での発光スペクトルを測定した。成績の良い融合タンパク質については、リコンビナントタンパク質を作製し、タンパク質標品での発光スペクトルを測定した。

### (2) 甲虫赤色ルシフェラーゼと BAF の発光強度の検討

甲虫赤色ルシフェラーゼ変異体と BAF の発現プラスミドを培養細胞 (35φ) に導入し、24 時間後に培地中にそれぞれの発光基質 (D-ルシフェリンとセレンテラジン) を添加し、培養ディッシュのまま、生細胞全体の発光スペクトルを測定した。

### (3) 細胞株の樹立

任意のレポーター遺伝子を導入可能な、器としての細胞株を BAF-Y を用いて樹立した。BAF-Y の発現ユニットと薬剤耐性遺伝子発現ユニットを loxP 配列とインスレーター配列とで入れ籠上に挟み込んだ直鎖状 DNA を NIH3T3 細胞に導入し、薬剤耐性で細胞株を樹立し、試験管内での発光強度で優良株をスクリーニングした。

### (4) リアルタイム 1 細胞生物発光イメージング

BAF-Y を導入した細胞に対して生物発光イメージング装置 (40x 対物レンズ使用) を用いて生物発光イメージングの最適化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規 BAF 変異体の創製

種々の GFP 変異体等の BAF 構成要素に関する 300 種類以上の組合せにより創出された融合タンパク質発現ベクターを各々培養細胞に導入し、セレンテラジンと細胞溶解液を用いた試験管内での発光スペクトルを測定し、新規 BAF 変異体を複数種開発した。そのうちの一部を図 1 に示す。

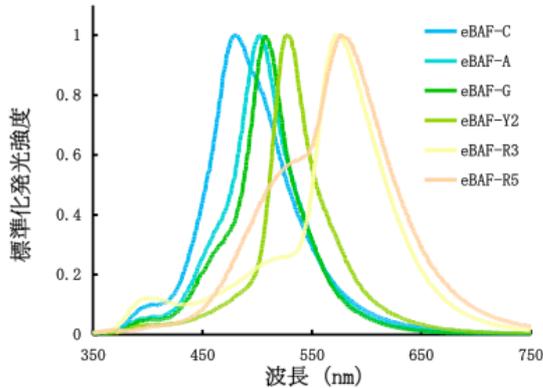


図 1. BAF 変異体の発光スペクトル

自己励起蛍光タンパク質 (BAF) 技術は、今後開発される新規の蛍光タンパク質、或いはルシフェラーゼ変異体にも幅広く応用可能な基盤的技術であることが確認された。

### (2) 生細胞での甲虫赤色ルシフェラーゼと BAF の発光強度の比較

ルシフェラーゼは極めて厳密な基質特異性を有する。その為、甲虫のルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの間では交差反応は起こらず、基質によりイメージングの対象を切り替えることが可能である。それぞれの単独発現において、BAF は GFP と同様に細胞内に一様に分布する一方で、甲虫ルシフェラーゼは細胞質に局在する性質を有する。即ち、転写因子の細胞内局在マーカーとして BAF が、遺伝子発現のレポーターとして甲虫ルシフェラーゼの利用が適当と考えられた。

試験管内の測定により得られた標準化発光スペクトルの比較から、BAF-C と甲虫ルシフェラーゼ赤色変異体 (BLuc (Red)) の組合せが比較的色分離が容易であると予想された。そこで、これらを培養細胞へ導入・発現させ、生きた細胞の発光スペクトルを測定した結果、等モルのプラスミド量を導入した際に両者の間には 2 桁以上の発光強度の差が認められた (図 2)。

ストレス応答性の遺伝子発現モニター用レポーター遺伝子をゲノムに挿入した安定細胞株の利用を可視化システムの前提とするため、一過性発現における発光強度の差は看過できるものではなく、今後の発光強度に優れた赤色ルシフェラーゼ変異体の開発が待たれる。但し、今回の結果は、必ずしも甲

虫系ルシフェラーゼの赤色変異体の併用を否定するものではなく、その可能性は将来に渡り、残しておくべきものと考える。

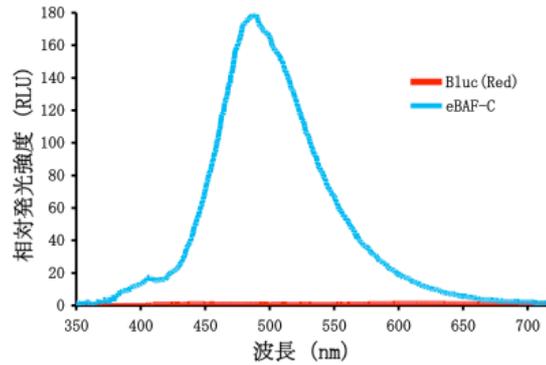


図 2. 生細胞での BAF-C と甲虫ルシフェラーゼ赤色変異体の発光強度の比較

### (3) ストレス応答性転写レポーターの“器”としての細胞株の樹立

目標とするリアルタイム 2 色同時生物発光イメージング技術の開発にあたり、転写制御モニター用レポーターが定まらないため、次善策として、任意のレポーターを組み可能な“器”としての細胞株の樹立を試みた。最も発光輝度の高い BAF-Y の遺伝子発現カセットと薬剤耐性遺伝子発現カセットをタンデムに直列し、これをリコンビナーゼ認識配列 (loxP) とインスレーター配列 (Ins) で入れ籠状に挟んだ遺伝子を構築し、NIH3T3 細胞株に導入した (図 3)。こうすることで、ゲノム上のインスレーター配列で挟まれた領域に、任意のレポーター遺伝子発現カセットと異なる薬剤耐性遺伝子 (例えばハイグロマイシン耐性遺伝子など) カセットを loxP 配列で挟んだ DNA 断片を Cre リコンビナーゼで組換え、新たに導入した薬剤耐性マーカーで選択することにより、目的のレポーター系を高率に発現する細胞株の取得が期待される。尚、最も発光輝度の高い細胞株においては、40 秒間程度の露光時間でのイメージングが可能なレベルの BAF-Y 発現が認められた。

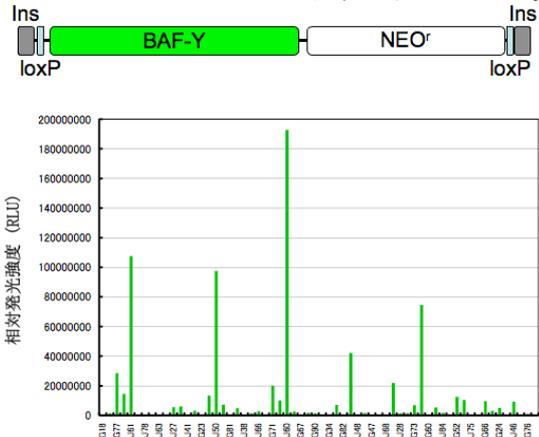


図 3. “器”としてのレポーター導入細胞株の樹立

(4) “リアルタイム” 発光イメージング技術への発展

自己励起蛍光タンパク質・BAFを用いた生物発光イメージングは、従来技術より極めて、空間解像度並びに時間解像度の高い1分毎の生物発光イメージングを可能にしたが、BAF-Yをより高性能化することにより、時間解像度を改善し、“リアルタイム” 発光イメージングの実現を試みた。

高輝度BAF-Yを一過性に導入した細胞にセレネラジンを添加し、40x対物レンズを使用し、18秒間の露光条件で1分間に3フレームの細胞発光画像を取得した(図4、図5)。尚、図中では、細胞の形態変化が判りやすいように細胞画像数を1/3に間引いて示してある。

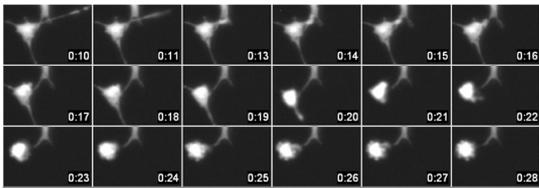


図4. 高輝度BAF-Yを用いた“リアルタイム”生物発光イメージングによるアポトーシス細胞の1分毎の形態変化過程の経時観察(各写真中の右下の数字は、“時間：分”で観察経過時間を示す)

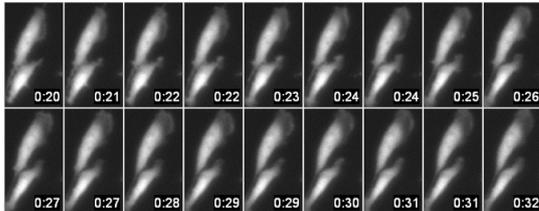


図5. 高輝度BAF-Yを用いた“リアルタイム”生物発光イメージングによる1分毎の細胞ラフリングの経時観察(各写真中の右下の数字は、“時間：分”で観察経過時間を示す)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- ① 星野英人\*、Current advanced bioluminescent technology on drug discovery、Expert Opinion on Drug Discovery、4、2009、373-389、査読有り、\* ; corresponding author
- ② 近江谷克裕、星野英人、クラゲの発光システムを利用した1細胞生物発光イメージング、化学と工業、62、2009、122-124、査読無し(寄稿依頼)
- ③ 近江谷克裕、星野英人、中島芳浩、生物発光で細胞活動を長時間計測する、バイオサイエンスとインダストリー 66、2008、

199-201、査読無し(寄稿依頼)

- ④ 星野英人\*、中島芳浩、近江谷克裕、Luciferase-YFP fusion tag with enhanced emission for single-cell luminescence imaging、Nature Methods、4、2007、637-639、査読有り、\* ; corresponding author

[学会発表](計5件)

- ① 星野英人、近江谷克裕、自己励起蛍光タンパク質BAFの開発並びにリアルタイム生物発光イメージングへの展開、第8回産業技術連携推進会議 ライフサイエンス部会 バイオテクノロジー分科会、2009年1月29日、つくば
- ② 星野英人、近江谷克裕、自己励起蛍光タンパク質BAF変異体の開発並びにリアルタイム生物発光イメージング、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会合同大会2008(BMB2008)、2008年12月12日、神戸
- ③ 星野英人、Development of BRET-based Auto-illuminated Fluorescent-protein (BAF) and Application to live-cell imaging、第15回国際生物発光化学発光学会大会、2008年5月15日、上海(招待講演)
- ④ 星野英人、中島芳浩、近江谷克裕、自己励起蛍光タンパク質BAFの開発と1細胞イメージングへの応用、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会2007(BMB2007)、2007年12月14日、横浜
- ⑤ 星野英人、中島芳浩、近江谷克裕、自己完結型蛍光タンパク質・BAFの開発と生細胞イメージングへの応用、第25回生物発光化学発光研究会、2007年6月30日、札幌

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：高いエネルギー移動効率を有するBRET発現系

発明者：星野英人 外1名

権利者：(独)産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願2007-267756

出願年月日：2007年10月15日(国内優先権主張出願)

国内外の別：国内

[その他]

- (1) プレスリリース：2007年7月9日「自ら光る蛍光タンパク質による高精度細胞イメージング技術の開発-外部照射光なしで光る蛍光タンパク質-」([http://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2007/pr20070709/pr20070709.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2007/pr20070709/pr20070709.html))
- (2) 報道関連情報：朝日新聞、日本経済新聞、日刊工業新聞、東京新聞、茨城新聞、京

都新聞、大阪日日新聞、ほか多数紙で報道（上記プレス発表を受けて）

(3) ホームページ等：

- ① 所属研究所情報誌「産総研 Today」  
2007 年 12 月号に掲載  
([http://www.aist.go.jp/aist\\_j/aistinfo/aist\\_today/vol07\\_12/p23.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/aistinfo/aist_today/vol07_12/p23.html))
- ② 研究代表者の研究内容紹介 HP  
(<http://unit.aist.go.jp/rice/research/celldyna/hoshino.htm>)
- ③ 研究代表者の研究業績紹介 HP  
(<http://unit.aist.go.jp/rice/research/celldyna/gyouseki-h.htm>)
- ④ 研究紹介（ストーリーミング映像）  
([http://www.aist.go.jp/aist\\_j/video/video\\_main.html#c](http://www.aist.go.jp/aist_j/video/video_main.html#c))

(4) 雑誌取材：ACCJ Journal Vol. 45 Issue 5, May 2008

(5) 一般依頼講演：

- ① 日本のノーベル賞科学者展、「ふしぎ発見！オワンクラゲが光る謎？」、2009年2月22日、大阪科学技術センター主催
- ② 第11回未来・医療イノベーションセミナー、「自己励起蛍光タンパク質 BAF の開発と1細胞イメージングへの応用」、2007年9月25日、北海道大学医学研究科主催

(6) 受賞等： THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY/OUP POSTER PRIZE 2008（第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008(BMB2008)）  
([http://www.oxfordjournals.org/our\\_journals/jbchem/posterprize.html](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jbchem/posterprize.html))

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 英人 (HOSHINO HIDETO)

(独) 産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：20371073